Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen

DIE BESCHLEUNIGTE ELIMINATION VON SULFADIMETHOXIN BEI HUNDEN DURCH PHENOBARBITAL

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

einer Hohen Medizinischen Fakultät der

Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Alfred Hildebrandt

aus Marienwerder

8362

1965

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen

DIE BESCHLEUNIGTE ELIMINATION VON SULFADIMETHOXIN BEI HUNDEN DURCH PHENOBARBITAL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Alfred Hildebrandt
aus Marienwerder

1965

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Dekan:	Professor Dr. med. W. Schulte
Berichterstatter:	Professor Dr. med. H. Remmer
Korreferent:	Professor Dr. med. F. Lembeck

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	METHODE und MATERIAL	2
	1. Tiere und Substanzen	2
	2. Bestimmung der Sulfonamide im Serum und Urin nach der Methode von BRATTON und MARSHALL	2
	3. Trennung der Metaboliten und des freien SDM	2
	a) Extraktion des Serums	4
	b) Extraktion des Urins	4
	4. Aufarbeitung der Faeces	6
	5. Berücksichtigung der Eiweißbindung	6
	6. Die bei der Diazotierung auftretende Fehlerbreite	6
	7. Papierchromatographische Auftrennung	8
	8. Zur Nomenclatur	10
III.	ERGEBNISSE	
	Die Elimination von SDM aus dem Serum ist bei Hunden unabhängig vom Ausmaß der Diurese.	10
	Die beschleunigte Elimination von SDM aus dem Serum nach Phenobarbital.	17
	Eine Azetylierung von SDM findet nicht statt.	17
	Die Ausscheidung von SDM durch die Niere wird von Phenobarbital beeinflußt. Sie geht mit entsprechenden Clearanceänderungen einher.	17
	Die Ausscheidung von SDM in Faeces.	22
IV.	DISKUSSION	26
V.	ZUSAMMENFASSUNG	34
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	35 - 38
	LEBENSLAUF	

Einleitung

Die Konzentration eines Pharmakons am Wirkungsort ist, neben Faktoren wie Resorption, Organdurchblutung, Verhältnis von Wasser- zu Fettlöslichkeit und Bindung an Eiweiß oder andere große Moleküle, vor allem abhängig von der Elimination, die entweder in einer Ausscheidung oder aber in einer Überführung in eine weniger wirksame und vor allem schneller ausscheidbare Verbindung besteht.

Die Elimination eines langwirkenden Sulfonamids, Sulfadimethoxin (Madribon) = SDM, war bei Ratten nach Vorbehandlung mit hohen Phenobarbitaldosen stark beschleunigt (REMMER). $D_a$bei wurde im Serum und im Urin eine hochpolare, mit Chloroform nicht extrahierbare Verbindung vermehrt ausgeschieden, die direkt diazotierbar war. Wegen der sicher nicht belanglosen therapeutischen Bedeutung dieses Befundes sollten durch Versuche an Hunden folgende Fragen beantwortet werden:

1) Wie und in welcher Form SDM normalerweise ausgeschieden wird, und ob äußere Faktoren die Elimination beeinflussen, um dann weiter zu sehen, ob

2) Phenobarbital die Elimination von SDM auch beim Hund stimuliert, und welche Verbindungen dabei besonders betroffen werden, und

3) ob der veränderten Elimination eine Änderung in der Ausscheidung entspricht.

Von den gefundenen Ergebnissen soll dann auf die therapeutische Konsequenz hingewiesen werden.

Methode und Material

1. Die Versuche wurden an zwei weiblichen, etwa eineinhalb Jahre alten Hunden durchgeführt, mit einem Körpergewicht von 21 kg (Dina) und 25 kg (Anka). Die Hunde waren Zwillinge und Bastarde reinrassiger Eltern (Seatter und Boxer). Zum Vergleich wurden die vorgenommenen Untersuchungen auch auf eine dreijährige Schäferhündin (Babsi) ausgedehnt. Die Hunde wurden mit Latz-Futter und rohem Fleisch gefüttert. Um eine genaue Kontrolle über die ausgeschiedenen Urinmengen zu erhalten, wurden die Hunde während des Versuches in Stoffwechselkäfigen aufbewahrt. Bei der Untersuchung des normalen SDM-Serumspiegels wurde Flüssigkeit entweder ganz weggelassen oder reichlich gegeben. Im letzten Fall erhielten die Tiere vor der Applikation des Sulfonamides und nach der 3. Serum- und Urinentnahme (fünf Stunden nach der SDM-Gabe) je 30 ml Wasser pro kg Körpergewicht durch eine Magensonde. Die Faeces von zwei Tagen wurden gesammelt und wie unten beschrieben aufgearbeitet.

   Die Hunde bekamen in allen Versuchen 50 mg/kg Sulfadimethoxin = SDM = 6-Sulfanilamido-2,4-dimethoxypyrimidin (MADRIBON) +) als Na-Salz 10 % i.v. injiziert. Die Entnahme von Serum und Urin erfolgte nach 1 - 2, 4, 5 - 6, 8, 12 und 24 Stunden. (Innerhalb dieser Zeiten variierten einzelne Abnahmen gering.) Blut wurde aus der V. brachialis, Urin durch einen Blasenkatheter gewonnen. Phenobarbital wurde in dünndarmlöslichen Kapseln vormittags per os verabreicht.

2. Im Serum, bzw. in stark verdünntem Urin, wurde vor und nach saurer Hydrolyse der Sulfonamidgehalt nach der Methode von BRATTON und MARSHALL bestimmt.

3. Von RIEDER stammen genaue Angaben über die Verteilung von SDM und seiner Metaboliten zwischen gleichen Teilen Wasserphase (bei pH 7,4) und mehreren organischen Lösungsmitteln.

   Die Extraktion mit Chloroform bei pH 5,5 erwies sich als zweckmäßiger als die mit Acetessigsäure bei gleichem pH.

+) Madribon und N_4-Azetylsulfadimethoxin wurden freundlicherweise von der Firma Hoffmann-La Roche zur Verfügung gestellt.

TABELLE 1

eingewogene Menge (mva 1)		wiedergefundene Menge vor Extraktion		nach Extraktion	
SDM	N_4-Azetyl-SDM	vor Hydrol.	nach Hydrol.	vor Hydrol.	nach Hydrol.
0,258		0,258	0,252	0,246	0,230
0,258		0,257	0,248	0,248	0,232
	0,258	0,0083	0,258	0,009	0,242
	0,258	0,0083	0,258	0,0085	0,250
0,206	0,052	0,217	0,258	0,197	0,240
0,206	0,052	0,216	0,254	0,197	0,252
0,129	0,129	0,132	0,254	0,127	0,248
0,129	0,129	0,133	0,252	0,124	0,244

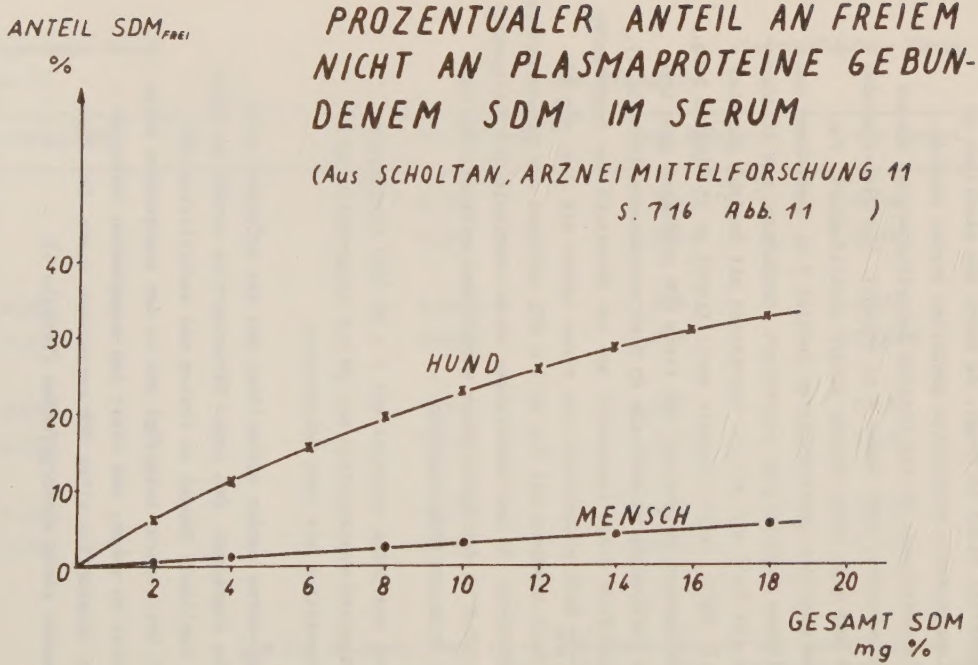
SDM und N_4-Azetyl-SDM in verschiedenen Mengen und Verhältnissen zueinander eingewogen. Die wiedergefundenen Mengen zeigen nur eine geringe Abweichung von den vorgegebenen Doppelwerten.

a) Extraktion des Serums:

Da die direkte Extraktion des Serums sich infolge der hohen Eiweißbindung des SDM an Plasmaproteine nicht als quantitativ erwies, wurde vor der Extraktion Serum mit Äthanol enteiweißt. Trichloressigsäure kam als Fällungsmittel nicht in Frage, da durch den niedrigen pH etwaige labile konjugierte Metabolite gespalten werden konnten. Äthanol fällte ausreichend: In ein breites Zentrifugierglas wurden je 1 ml Serum pipettiert, dazu kamen 4 ml Äthanol. Die Gläser wurden gut geschüttelt und nach einer Stunde scharf zentrifugiert. Vom Überstand wurden nach dem Zentrifugieren jeweils 3 ml abgenommen und in ein geschliffenes Schüttelglas pipettiert. Ansäuerung mit Standard-Na-Acetatpuffer (pH 4,6) auf pH 5,5. Extraktion mit dreimal gleicher Menge - 10 ml - $CHCl_3$ (DAB 6 doppelt destilliert) je 15 Minuten lang. Unter diesen Bedingungen gelang es, das freie SDM praktisch ganz und die azetylierte Verbindung zu mehr als 95 % zu extrahieren (Tabelle 1). Das gesamte Chloroform wurde abgedampft und der Rückstand zur schnelleren Lösung in 2 ml $\frac{n}{100}$ NaOH aufgenommen und etwas später mit 2 ml $\frac{n}{100}$ HCl neutralisiert. Nach Ansäuern mit 0,2 ml 4 n HCl erfolgte die Diazoreaktion vor und nach Hydrolyse. In der Wasserphase wurde ebenfalls der Sulfonamidgehalt bestimmt: 0,5 ml der Wasserphase wurden abpipettiert, der Rest verworfen; nach Ansäuern Diazoreaktion.

b) Die Extraktion des Urins erfolgte mit 1 : 50 (25) verdünntem Harn, der mit Standard-Azetatpuffer auf pH 5,5 eingestellt war; anschließende Extraktion wie oben beschrieben.

Kontrollurin und -serum wurden mitbestimmt und der gefundene Wert beider Berechnung abgezogen. Bei jeder Versuchsreihe wurden im Sinne einer Eichreihe bestimmte Mengen an freiem und azetyliertem SDM dem Kontrollurin bzw. -serum beigefügt und in der angegebenen Weise bestimmt, um sicher zu gehen, daß unter den angegebenen Versuchsbedingungen auch tatsächlich alles SDM extrahiert wurde. Die zugefügten Mengen wurden stets wiedergefunden (Tabelle 1).



Prozentualer Anteil an freiem, nicht an Plasmaproteine gebundenem SDM im Serum in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration.

Die Farbintensität nach der Kupplungsreaktion wurde bei = 547 mu am Beckman-Spektrophotometer gemessen.

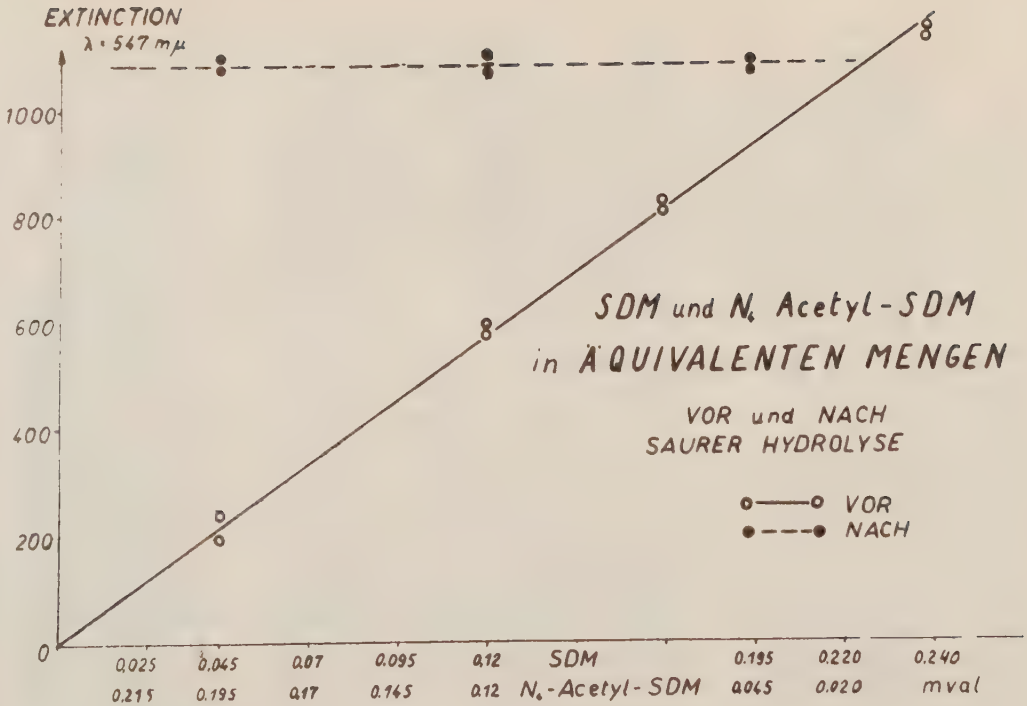
4. Die Faeces wurden von den Hunden getrennt gesammelt, um evtl. vorhandenes SDM zu bestimmen. Die Mengen wurden gewogen und, mit Wasser verdünnt, homogenisiert. Ein aliquoter Teil wurde entnommen und zur weiteren Untersuchungen mehrfach filtriert und zentrifugiert. Eine verdünnte Menge dieser Lösung wurde angesäuert und gegen einen Leerwert diazotiert. Extraktion in Chloroform wie oben beschrieben bei pH 5,5.

   Um eine eventuell vorhandene Aufspaltung von konj. SDM während der Verweildauer im Darm zu erfassen, wurde den Faeces nicht behandelter Hunde konj. SDM hinzugegeben, das aus dem Urin mit SDM behandelter Hunde nach Fällung mit Bleiazetat und anschließender Extraktion mit Chloroform gewonnen wurde. Um den genauen Anteil des konj. SDM in diesem Produkt zu bestimmen, wurde der Sulfonamidgehalt vor und nach Chloroformextraktion gemessen. Die in der Wasserphase enthaltene Menge wurde als Glucuronidgehalt angenommen.

   Inkubiert wurden 2 g Hundekot mit 1 ml (0,5 ml) Glucuronid in einem Erlenmeyer-Kolben; diesem Ansatz wurden 10 ml H_2O hinzugefügt. Das Inkubat blieb 48 Stunden im Brutschrank bei 37° C. Die Aufarbeitung und Bestimmung erfolgte, nach mehrmaliger Filtration, wie oben angegeben.

5. Der Anteil des nicht an Protein gebundenen SDM wurde nicht bestimmt. Als Grundlage für die Bestimmung des Ausmaßes der Eiweißbindung gelten die von SCHOLTAN gemachten Angaben (Arzneimittelforschung 11, S. 712, Abb. 11) über den Anteil des ungebundenen SDM an der im Serum von Hunden vorhandenen Gesamtkonzentration (Abb. 1).

6. Die Bestimmung der Sulfonamide nach der Methode von BRATTON und MARSHALL wies eine nur geringe Fehlerbreite auf.
   ($2{,}26 \pm 1{,}73$ %; n = 60.)



SDM und N_4-Acetyl-SDM in äquimolaren Mengen zueinander eingewogen, vor und nach saurer Hydrolyse. Die Diagonale zeigt das diazotierbare SDM vor, die Horizontale nach der Hydrolyse. SDM und N_4-Acetyl-SDM ergeben zusammen immer 0,24 mval.

Die Diazotierung abgewogener Mengen N_4-Azetyl-SDM zeigte einen schon vor der Hydrolyse vorhandenen Anteil an freiem SDM von 2 - 4 %. Azetyliertes SDM und freies SDM wurden in verschiedenen Verhältnissen zueinander diazotiert. (Vor und nach Hydrolyse, bzw. vor und nach Extraktion mit anschließender Hydrolyse.) Der Vergleich der wiedergefundenen Menge zur vorgegebenen zeigt einen nur geringen Unterschied von 2 - 5 %. (Abb. 2, Tabelle 1).

7. Die in der Wasserphase nach Chloroformextraktion zurückgebliebene polare Verbindung wurde papierchromatographisch untersucht; ebenfalls das aus Serum, Urin und Faeces in die Chloroformphase eingangene freie SDM.

Die Wasserphase wurde durch Gefriertrocknung eingeengt und (in H_2O gelöst) chromatographiert. Einem Verfahren von KOECHLIN und KAMIL folgend, konnte die polare Verbindung auch auf folgende Weise geprüft werden:
Hundeurin mit Eisessig auf pH 4 angesäuert, wurde mit Bleiazetat gefällt und der Überstand im Vakuum eingeengt; anschließend viermal mit gleichem Volumen (20 ml) Chloroform extrahiert. Die Wasserphase wurde bei pH 8 mit gesättigtem, wässrigem, basischem Bleiazetat gefällt. Der Niederschlag wurde in Wasser gelöst und Schwefelwasserstoff eingeleitet, um das Blei zu entfernen. PbS wird abfiltriert und der Überstand im Vakuum eingeengt und dann chromatographiert. Mit den Proben wurden als Vergleichswerte wässrige Lösungen von SDM und N_4-Azetylsulfadimethoxin laufen gelassen. Folgende Systeme wurden auf Whatman 1-Papier auf- oder absteigend angewandt: (LANGECKER)

1. Methanol, aufsteigend, Laufzeit (LZ) 1,5 Std.
2. KCl 20 %, aufsteigend, LZ 1,5 Std.
   absteigend, LZ 2 Std.
3. n/10 CH_3COOH auf- und absteigend 2 Std.
4. n-Butanol 40 Teile (9 : 1 verd. mit Methanol) : NH_4OH
5. n-Butanol : n/10 CH_3COOH, absteigend, LZ 11 Std.
6. n-Butanol : n NH_4OH aufsteigend 8 Std.

Für den Nachweis der aromatischen Aminogruppe wurde das Papier nach dem Trocknen zur Kenntlichmachung der Flecken mit folgenden Reagenzien besprüht:

1. 0,2 % $NaNO_2$-Lösung in 10 % Trichloressigsäure
2. Eine Lösung von 100 mg N-(1-Naphthyl)äthylendiamindihydrochlorid in 95 ml n-Butanol und 5 ml 2 n HCl (4 Min. nach der Diazotierung).

Der Nachweis des azetylierten Produktes erfolgte im UV-Licht. N_4-Azetylderivat wurde bei leicht alkalischer Reaktion in Lösung gebracht und ebenso wie MADRIBON chromatographiert. (Abb. 11, Tabelle 8)

8. Für die verschiedenen SDM-Verbindungen werden folgende Termini gebraucht:
direktes SDM: der durch direkte Diazotierung bestimmbare Anteil.
azetyliertes SDM = indirektes: Menge des zusätzlich nach der Hydrolyse gefundenen Anteils an diazotierbarem SDM.
freies SDM: in Chloroform lösliches direktes SDM.
konjugiertes = glukuronidiertes SDM: direktes SDM, das durch Chloroform nicht extrahierbar ist (azetyliertes SDM hier ausgeschlossen.).

Ergebnisse

Erhalten Hunde 50 mg/kg Sulfadimethoxin i.v., so findet eine gleichmäßige Elimination der Substanz aus dem Serum statt.
(Vgl. Abb. 3 - 5 und Tabelle 2)

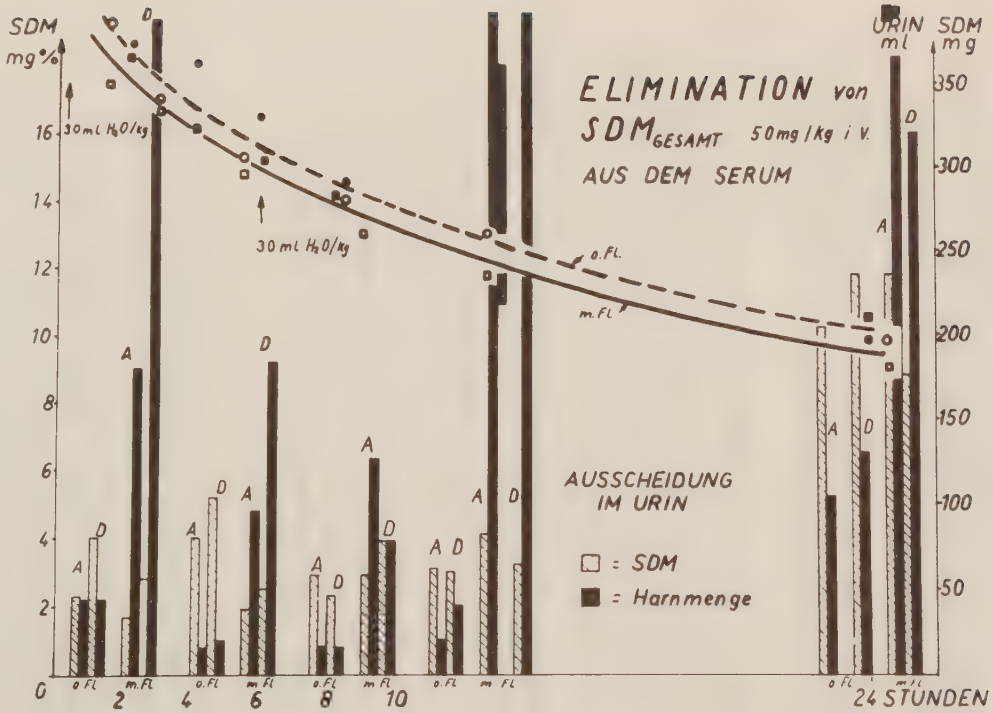
Über 95 % des SDM liegt als freies vor. Der Rest bestand aus einem oder mehreren wasserlöslichen Konjugaten. Azetyliertes SDM war nicht nachweisbar.

Untersucht man die Bedeutung verschiedener äußerer Momente, wie Flüssigkeits- und Nahrungszufuhr, Aufenthalt im Stoffwechselkäfig oder im Freigehege für die Elimination, so zeigt sich in 8 Versuchen an zwei Hunden (Mittelwerte und Streuung), daß diese die Geschwindigkeit der Elimination nicht beeinflussen.

Um den Einfluß der Diurese auf die Ausscheidung genauer zu untersuchen, wurden den beiden Hunden einmal 50 ml/kg SDM i.v. gegeben, ohne daß dabei Flüssigkeit gereicht wurde. Der Harnfluß variierte dabei nur zwischen 0,1 und 0,19 ml/min entsprechend einem Mittel von 0,15 $\pm$ 0,1 (n = 10). Zum anderen Mal wurden bei der gleichen SDM-Menge zweimal je 30 ml/kg Wasser durch eine Magensonde sowohl vor der Applikation des SDM, als auch nach der 3. Abnahme von Serum und Urin gegeben, wobei der Harnfluß zwischen 0,2 und 4,5 ml/min, also um mehr als das 20fache schwankte.

Wie die Tabellen 2 und 3 und die Abbildungen 3 und 4 zeigen, ist die reichliche Flüssigkeitszufuhr ohne größeren Einfluß auf die Elimination von freiem SDM. Sie wirkt sich ebenfalls nicht auf die ausgeschiedene Menge sowie auf die Clearance des freien und konjugierten SDM aus (Tab. 3 und 4). Bei der 4. Abnahme, nachdem die Hunde Wasser ein zweites Mal erhalten hatten, stieg bei einem Harnfluß von über 2,50 ml/min die Ausscheidung des freien und konjugierten SDM gering an, erreichte aber schon nach einigen Stunden wieder das ursprüngliche Niveau.

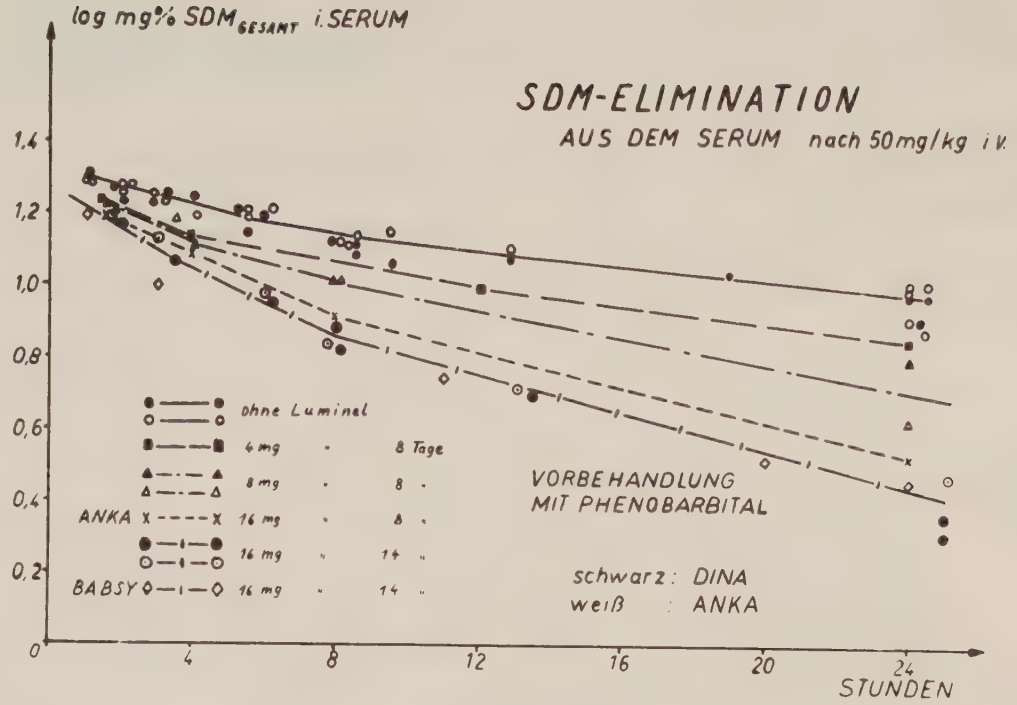
ABBILDUNG 3



Der Abfall von SDM gesamt in mg % im Serum und die Ausscheidung von SDM im Urin im Vergleich zur in gleicher Zeit ausgeschiedenen Urinmenge.

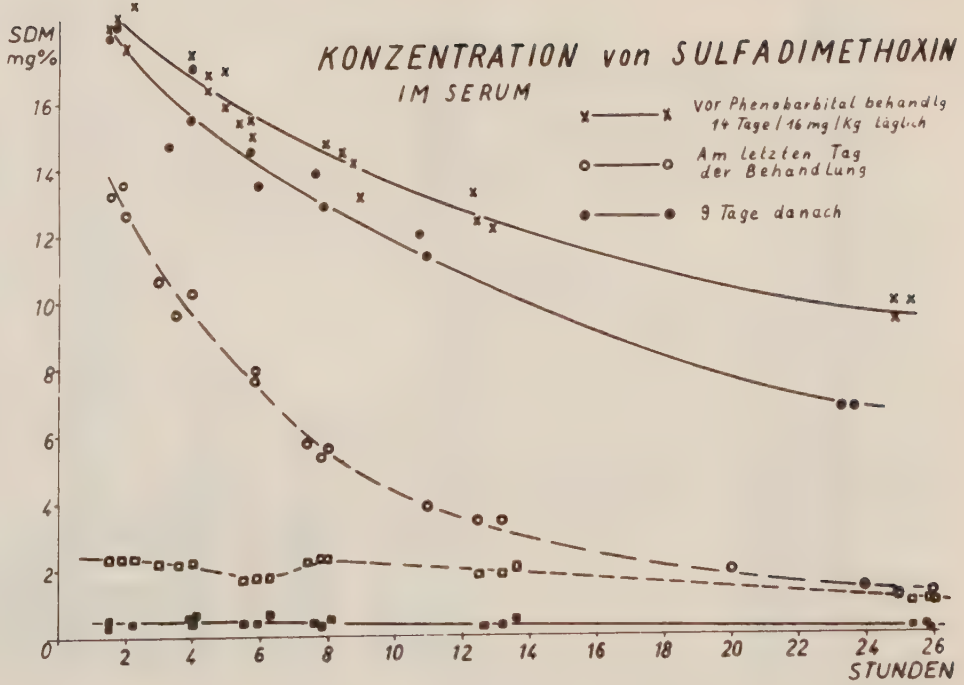
Die unterbrochene Kurve stellt den SDM-Spiegel bei geringer, die ausgezogene Kurve bei großer Diurese dar. A = Anka, D = Dina, o. Fl. = ohne Flüssigkeitszufuhr, m. Fl. = mit Flüssigkeitszufuhr (2 x 30 ml H_2O/kg Körpergewicht). Die Pfeile geben den Zeitpunkt der Flüssigkeitszufuhr an.

ABBILDUNG 4



Halblogarithmische Darstellung des Abfalls von SDM im Serum bei 2 Hunden nach Gabe von 50 mg/kg SDM. Die Punkte entsprechen der jeweils gefundenen Gesamtmenge. Die Vorbehandlung mit Phenobarbital zeigt eine deutliche Dosiswirkungsbeziehung (vgl. Tab. 5).

ABBILDUNG 5



Der Abfall des Serumspiegels von freiem Sulfadimethoxin bei 2 Hunden. (Bei einem 3. Hund Babsy ♀, 22 kg, wurden bei der gleichen Versuchsanordnung die gleichen Werte gefunden.) Die Kurven stellen die erhaltenen Ergebnisse dar, vor und während täglicher Behandlung mit Phenobarbital (16 mg peroral/kg) über 14 Tage am letzten Tage der Behandlung und 9 Tage später. Die schwarzen Quadrate nahe der Abszisse zeigen die kaum meßbare Konzentration an SDM-Konjugaten im Serum vor der Behandlung. Die weißen Quadrate stellen den mächtigen Anstieg dieser Verbindungen am letzten Behandlungstag dar.

TABELLE 2 a

Elimination von SDM aus dem Serum

Zeit nach Injektion in Stunden		1,5	4	6	9	13	25
SDM	frei in mg%						
	Kontr.	18,5	17,2	15,4	13,5	12,4	9,4
	Phenobarb.	13,12	10,1	7,6	5,35	3,3	1,4
	Nach 9 Tgn.	18,3	15,5	14,1	13,4	11,6	6,7
SDM	konj. in mg%						
	Ko	0,5	0,4	0,4	0,3	0,35	0,15
	Phenobarb.	2,4	2,2	1,7	2,3	1,9	1,1
	Nach 9 Tgn.	0,53	0,37	0,35	0,24	0,2	0,14
SDM	Gesamt in mg%						
	Ko	19,3	18,1	16,2	13,7	12,8	9,5
	Phenobarb.	16,0	12,3	9,3	7,4	5,2	2,3
	Nach 9 Tgn.	19,0	16,0	14,4	13,6	11,8	6,9
Anteil konj. in %							
	Ko	2,6	2,5	2,5	2,2	2,7	1,6
	Phenobarb.	15,0	18,0	18,0	31,0	36,0	41,0
	Nach 9 Tgn.	2,8	2,3	2,3	2,3	1,8	1,4

Sulfadimethoxin im Serum vor, während und neun Tage nach der Behandlung mit Phenobarbital, mit Berücksichtigung der verschiedenen Fraktionen.
Bei den aufgeführten Zahlen handelt es sich um gefundene und nicht um berechnete Werte. Die Summe aus gefundenem freiem und konjugiertem SDM weicht deswegen gering von der insgesamt gefundenen Madribonmenge ab.

TABELLE 2 b

Elimination von SDM aus dem Serum

	Perioden		I	II	III	IV	V
Zeit nach Injektion	Stunden		1,5 - 4	4 - 6	6 - 9	9 - 13	13 - 25
% Abnahme der Konzentration während der einzelnen Perioden							
	Ko		11,2 ± 2,0	7,2 ± 0,8	10 ± 1,8	11 ± 2	20 ± 3
	Phenobarb.	A	37,5	29,0	40,5	26,8	42,0
		D	40,0	28,0	37,5	27,2	47,0
		B	41,0	29,5	-	66	40,0
	Nach 9 Tgn.	A	13,7	8,6	12,0	12,0	31,0
		D	14,1	10,6	12,0	13,0	29,0
Halbwertszeit (Stunden)							
	Ko		11,5	13,9	15	18	30
	Phenobarb.		2	3,5	4	7,5	12
	Nach 9 Tgn.		9	10	13	16	20

Die Stunden sind zu 5 Perioden zusammengefaßt, die einzelnen Werte stellen die bei den einzelnen Hunden gefundenen Werte dar.

A = Anka D = Dina B = Babsy

TABELLE 3

Ausscheidung von SDM im Urin

	Perioden		I	II	III	IV + V	Summe	Anteil in %
Zeit nach Injektion								
	Stunden		0 - 4	4 - 6	6 - 9	9 - 25		
SDM								
frei	o. Fl.	A	(19,5)	(16,5)	(20,5)	(81)	(136,5)	(41)
Kontr.		D	(32,5)	(14,3)	(8,7)	(91)	(146,5)	(42,5)
	m. Fl.	A	8,7	11,9	16,2	67	103,8	30
		D	15,4	10,6	15,3	70	111,3	38
Phenobarb.		A	76,6	54,7	33,7	152	317,0	67
		D	90,0	49,0	40,0	150,5	329,5	67
Nach 9 Tgn.		A	12,0	10,1	11,8	109	143,6	53
		D	31,6	9,0	26	61	127,6	56
SDM								
konj.	o. Fl.	A	(40,7)	(32,1)	(31,3)	(91,8)	(195,9)	(59)
Ko		D	(44,5)	(25,2)	(16,8)	(103,0)	(199,5)	(58)
	m. Fl.	A	21,0	37,0	54,0	134,4	246,4	70
		D	29,3	22,1	39,0	88,0	178,4	62
Phenobarb.		A	40,6	32,8	21,6	62,5	157,5	33
		D	43,8	24,2	24,0	72,2	164,2	33
Nach 9 Tgn.		A	24,9	25,5	3,0	72,4	124,8	47
		D	13,4	18,7	5,6	61,9	99,4	44
SDM								
Gesamt	o. Fl.	A	(60,2)	(48,7)	(51,8)	(172,8)	(333,4)	
Ko		D	(77,0)	(39,5)	(25,5)	(194)	(345,5)	
	m. Fl.	A	29,7	48,9	70,2	201,4	350,2	
		D	44,7	32,7	54,3	158,0	289,7	
Phenobarb.		A	117,2	87,5	55,3	214,5	474,5	
		D	133,8	73,2	64,0	222,7	493,5	
Nach 9 Tgn.		A	36,9	36,6	14,8	181,4	268,4	
		D	45,0	27,7	31,6	122,9	227,0	

Die Ausscheidung von SDM bei Hunden vor, während und 9 Tage nach der Behandlung mit Phenobarbital. Die Zahlen stellen die bei den Hunden am Ende der entsprechenden Perioden gefundenen Werte dar.

A = Anka D = Dina

Die Tatsache, daß die Clearance von freiem SDM nach Flüssigkeitszufuhr nicht ansteigt, sondern sogar abfällt, hängt mit der pH-Änderung des Urins zusammen, der hier bei höherem Harnfluß sinkt, wodurch die Dissoziation von SDM abnimmt. Die nun bessere Lipoidlöslichkeit des SDM begünstigt seine Rückdiffusion. Dadurch nimmt seine Ausscheidung trotz eines höheren Harnflusses ab (Tab. 4 und Abb. 3).

Werden Hunde über längere Zeit mit Phenobarbital behandelt, so zeigte sich nach Injektion von 50 mg/kg SDM ein deutlich beschleunigter Abfall des gesamten Sulfonamids im Serum, der schon nach einer Dosis von 4 mg/kg zu beobachten war. Dosen von 8 mg und 16 mg Phenobarbital über den gleichen Zeitraum von 8 Tagen täglich peroral gegeben, setzten den SDM-Spiegel noch schneller herab. Wurde Phenobarbital (16 mg/kg pro die) 14 Tage lang verabreicht, so war der Effekt an beiden Hunden größer als bei Applikation der gleichen Dosis über 8 Tage. Genauso verhielt sich eine dritte Hündin (Babsi) (Tab. 3, Abb. 4). Wie Tabelle 5 und Abbildung 5 zeigen, ist die Wirkung von der Dosis abhängig. Der Abbildung 5 ist auch zu entnehmen, daß ein exponentieller Verlauf des Abfalls der Konzentration im Serum erst ab der 9. Stunde vorhanden ist. Daher wird die prozentuale Abnahme während der einzelnen Perioden berechnet und daraus die HWZ in den verschiedenen Zeiträumen kalkuliert. Durch die Vorbehandlung mit Phenobarbital sinkt die Halbwertszeit im Serum von der 1,5. Stunde bis zur 4. Stunde von 11,5 auf 2 Stunden ab (Tab. 2 b).

Wird 9 Tage nach Absetzen der Behandlung noch einmal SDM injiziert, so fällt die Konzentration im Serum immer noch etwas schneller ab. Der Effekt ist aber fast abgeklungen.

Vor und nach Hydrolyse ließen sich in Serum und Urin identische Werte bestimmen. Eine Azetylierung des Sulfadimethoxins fand also nicht statt, auch nicht nach Vorbehandlung der Hunde mit Phenobarbital.

Die im Urin ausgeschiedene Gesamtmenge des SDM stieg, während der Behandlung appliziert, von 27 % (unbehandelt) auf 36 % der insgesamt verabreichten Menge. Obwohl die Gesamtausscheidung nur um 33 % anstieg,

TABELLE 4

			ml/min/kg	Clearance-Rate	pH Urin
Clearance SDM frei (nicht eiweiß-gebunden) (vgl. SCHOLTAN)	Ko	o. Fl.	(0,08 ± 0,04)	(0,02)	(7,5 - 0,6)
		m. Fl.	0,08 ± 0,006	0,02	6,5 ± 0,05
	Phenobarbital		0,81 ± 0,25	0,2	6,5 ± 0,5
	Nach		0,14 ± 0,06	0,35	6,7 ± 0,7
Clearance SDM frei (bestimmt d. h. ohne Berücksichtigung der Bindung an Eiweiß)	Ko	o. Fl.	(0,024 ± 0,06)	(0,006)	
		m. Fl.	0,025 ± 0,04	0,006	
	Phenobarbital		0,23 ± 0,08	0,055	
	Nach		0,05 ± 0,03	0,01	
Clearance SDM konj.	Ko	o. Fl.	(3,00 ± 0,24)	(0,712)	
		m. Fl.	2,1 ± 0,7	0,5	
	Phenobarbital		0,26 ± 0,21	0,06	
	Nach		1,94 ± 0,90	0,30	

Clearance Creatinin: 4,29 ± 1,01 (n = 70)
vgl. C. R. HOUCK, Am. J. Physiol. 153 (1948)

TABELLE 5

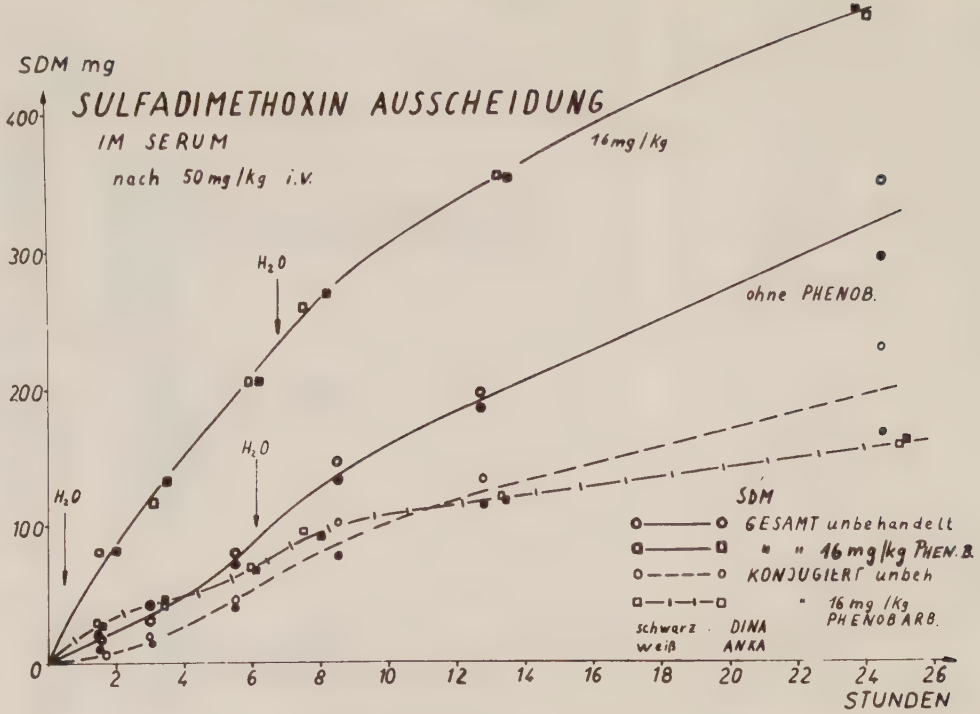
Phenobarbital mg/kg	Dauer der Vorbehandlung Tage	% Abfall	H W Z 1,5 - 9 Std.	13 - 25 Std.
--	--	25	15	26 - 35
4	8	29	13	24
8	8	35	10	18
16	8	53	7	16
16	14	75	5	13
16	9 Tage nach Absetzen	31	12	20

Die Elimination von SDM (gesamt) in Abhängigkeit von der Höhe der Phenobarbitaldosierung und der Dauer der Behandlung. Die Wirkung, dargestellt in biologischer Halbwertszeit, ist proportional der Höhe der gegebenen Phenobarbitaldosis.

Tabelle 4

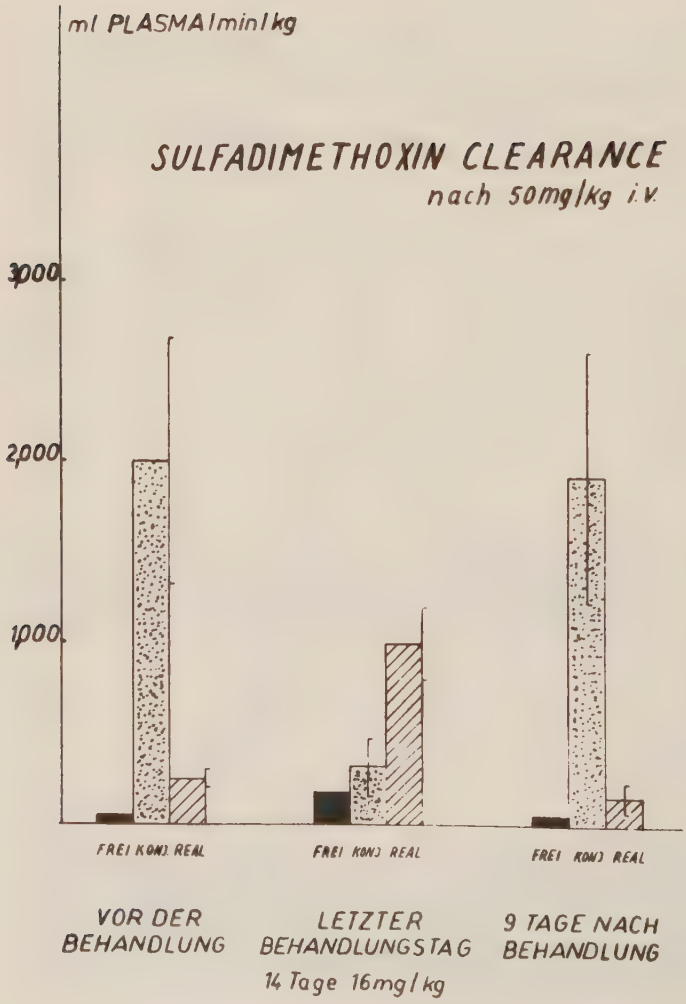
Die Änderung der Clearance von freiem, glukuronidiertem und nicht eiweißgebundenem SDM vor, am letzten Tag und 9 Tage nach einer Behandlung mit Phenobarbital 16 mg/kg 14 Tage lang. Die aufgeführten Daten stellen Mittelwerte von je 4 Clearance-untersuchungen bei 2 Hunden dar. Auffällig ist die Abnahme der Clearance des glukuronidierten SDM während der Behandlung mit Phenobarbital.

ABBILDUNG 6



Die Ausscheidung von SDM im Urin vor und während der Behandlung mit Phenobarbital. Es fällt die geringe Menge an Glukuroniden unter der Behandlung auf.

ABBILDUNG 7



Vergleichende Darstellung der Clearance des freien SDM, des konjugierten und des freien unter Berücksichtigung der Eiweißbindung = reale Clearance.

änderte sich gänzlich das Verhältnis von freiem zu konjugiertem SDM (Tab. 3). Die Ausscheidung des konjugierten SDM war herabgesetzt, dagegen stieg es im Blut von 1 - 4 % auf 15 - 41 % an. Geht man von der Voraussetzung aus, daß das Verhältnis vom freien zum konjugierten SDM bei der Passage durch die Niere nicht geändert wird, und daß es sich bei den konjugierten Verbindungen um Substanzen handelt, deren Clearance nicht differiert, dann lassen sich die Clearancewerte vom freien und vom konjugierten SDM errechnen. (Tab. 4, Abb. 7). Die Clearance des freien Madribons steigt während der Phenobarbitalbehandlung auf das 4- bis 5-fache, während die Clearance des konjugierten auf 1/10 absinkt.

Bei dem vermehrten Gehalt von konjugiertem SDM im Serum unter der Behandlung mit Phenobarbital ist die Möglichkeit eines vermehrten Abgangs der Glukuronide via Galle gegeben. Die Ausscheidung von SDM in Faeces wurde während der Vorbehandlung mit Luminal 16 mg/kg und 9 Tage nach Absetzen der Behandlung untersucht. Ein Vergleich zu unvorbehandelten Tieren fehlt hier. Während der Phenobarbitalbehandlung wurde innerhalb 48 Stunden nach der SDM-Gabe 3- bis 4mal SDM mehr in Faeces ausgeschieden als 9 Tage später. Der Anteil an konjugiertem SDM sank von 15 % auf 2 - 4 % ab. Das bedeutet, daß unter der Behandlung die nachweisbare Menge von konjugierter Verbindung in Faeces auf das 20fache anstieg.

In den Faeces wiedergefundenes SDM:

		gesamtes SDM in % der gegebenen Menge (50 mg/kg)	mg	frei	konj.
während der Behandlung		8,0	4	3,4	0,6
9 Tage nach Absetzen	A	2,0	1	0,97	0,03
	D	3,4	1,5	1,45	0,05

Die Resorption von SDM aus dem Darm ist von der dort vorhandenen Konzentration des freien SDM abhängig und wird ständig durch bakterielle Spaltung der Konjugate erhöht. Ein Hinweis auf das Ausmaß der Spaltung ergibt sich aus folgendem Versuch:

TABELLE 7

Ansatz	direkte Diazotierung	Diazotierung der Wasserphase nach Extr.	
10 ml Wasser pH 6,8 1 ml Glucuronidlösung sofort diazotiert	100 % 0,500 mg/ml	d. gesamt. Menge (in %)	68 % = 0,340 mg/ml der Glucuronidlösg. (68 % = 100 %)
10 ml Wasser pH 6,8 1 ml Glucuronidlösung 48 Std. inkubiert 37° C	93 % 0,465	60,5 0,300	89 0,3
2 g Faeces 10 ml Wasser 1 ml Glucuronidlösung 48 Std. inkubiert 37° C	93 % 0,465	19,8 $\frac{1}{3}$ 0,100	28 0,1
2 g Faeces 10 ml Wasser 0,5 ml Glucuronidlösung 48 Std. inkubiert 37° C	93 % 0,465	7,2 $\frac{1}{8}$ 0,036	 0,036

Spaltung von SDM-Glukuroniden in den Faeces nicht behandelter Hunde. Nach Fällung mit Bleiacetat und anschließender Extraktion in Chloroform gewonnen. 1 ml der inkubierten Menge wurde bis 1/3 und 0,5 ml bis über 1/7 gespalten.

SYSTEM	METHANOL	KCl 20 %	n/10 CH_3COOH	n BUTANOL n/10 CH_3COOH	40 n BUTANOL (4:1 verd. mit Methanol) 10 konz. NH_4OH 50 H_2O	n BUTANOL n NH_4OH 1:1
ZEIT	1,5 Std.	2 Std.	2 Std.	11,5 Std.	5,5 Std.	5 Std.
1. SULFADIMETHOXIN "MADRIBON" R	0,74	↑ 0,56 ↓ 0,62	0,58 ↓	0,884	0,44	0,75
2. $CHCl_3$-Phase						
a) Serum		↓ 0,63	0,59			
b) Urin		↓ 0,63	0,59			
c) Faeces		↓ 0,63	0,58			
3. N_4-ACETYL-SDM (UV)	0,73	↑ 0,63 ↓ 0,65	0,62	0,875	0,60	0,70
4. WASSERPHASE						
a) Serum				nach Fällung mit		
2. Metabolit		↓ 0,75	0,79	Bleiacetat	0,72	
3. Metabolit		↓ 0,86	0,86	↓		
b) Urin				a) 0,406		
1. Metabolit		↓ 0,68		b) 0,328		
2. Metabolit		↓ 0,76	0,79	c) 0,193		
3. Metabolit		↓ 0,86	0,86	d) 0,094		

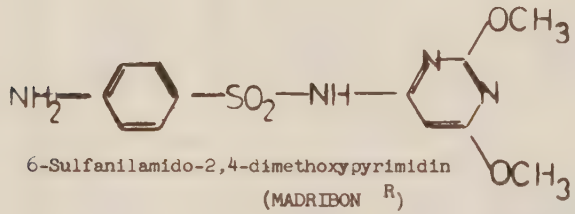
↑ = aufsteigend

↓ = absteigend

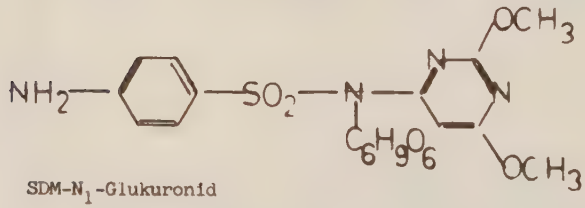
Papierchromatographische Verarbeitung von SDM und dessen Metaboliten aus Serum, Urin und Faeces.

Wird glukuronidiertes SDM in Faeces nicht behandelter Hunde inkubiert (48 Stunden / 37° C), so war eine Abnahme auf ungefähr 1 Drittel des dem Inkubat zugesetzten Glukuronids zu beobachten (Tab. 7).

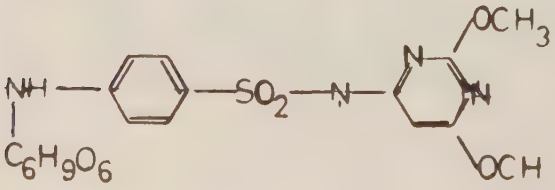
Die nach Extraktion mit Chloroform in letzteren unlöslichen Verbindungen wurden papierchromatographisch getrennt. Dabei stellte sich heraus, daß es sich bei diesen wasserlöslichen Konjugaten um 2 Substanzen handelte, deren R_f-Werte in Serum und Urin gleich waren (Abb. 8). Entsprechend ihrem Verhalten und Vorkommen handelte es sich um die gleichen Verbindungen wie die von BRIDGES, KIBBY und WILLIAMS beim Hund gefundenen N_1- und N_4-Glukuronide. (Tab . 8)



6-Sulfanilamido-2,4-dimethoxypyrimidin
(MADRIBON R)



SDM-N_1-Glukuronid



SDM-N_4-Glukuronid

ABBILDUNG 8

N.-A.	MADRIBON	URIN	SERUM	URIN	SERUM	FAECES
SDM		wäßrige Phase	wäßrige Phase	$CHCl_3$ Phase	$CHCl_3$ Phase	$CHCl_3$ Phase
Rf 0,65	0,63	1) 0,68		0,63		
		2) 0,76	2) 0,75	Laufzeit 2 Stunden		
		3) 0,87	3) 0,86	K Cl 20% absteigend		

Papierchromatographische Auftrennung von SDM nach der Extraktion mit $CHCl_3$. In der wässrigen Phase von Serum und Urin sind zwei identische Substanzen nachweisbar, im Urin ist noch eine dritte wasserlösliche Substanz vorhanden.

Diskussion

Die langsame Ausscheidung von Madribon in seiner freien, d. h. unveränderten Form ist von folgenden Faktoren abhängig:

1) von der Konzentration des ungebundenen SDM im Plasma, da nur das nicht an Plasmaproteine gebundenen glomerulär filtriert werden kann. Infolge seiner hohen Eiweißbindung (über 95 % beim Menschen (SCHOLTAN) und über 70 % beim Hund) werden entsprechend geringere Mengen ausgeschieden.

2) Durch die Art und Weise, wie die Ausscheidung erfolgt. SDM wird vor allem glomerulär filtriert, kann aber wahrscheinlich auch in geringerem Umfang als schwacher Elektrolyt aktiv sezerniert werden.

3) Vom Ausmaß seiner passiven Rückdiffusion in den distalen Tubuli. Daß dieser Vorgang von der Lipoidlöslichkeit abhängt sowie von dem pH des Urins, wurde schon erwähnt.

4) Von der gleichzeitigen Umwandlung in andere besser wasserlösliche Substanzen, vor allem als Glukuronide und azetyliertes SDM. Das Ausmaß dieser Umwandlung ist folgender Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 9

		Blut	Urin	Proteinbindung (SCHOLTAN)	HWZ
MENSCH	frei	85	7	höher als 95	28 - 34
in % der erh.	azet.	10	15		
Dosis	gluk.	5	78		
HUND	frei	95	37	70 - 80 %	26 - 28
	azet.	-	-		
	gluk.	5	63		

Es ist zu sehen, daß im Urin von Mensch und Hund hohe Mengen an glukuronidiertem SDM erscheinen, im Serum ist dagegen sehr wenig vorhanden (vgl. Tab. 9). Es errechnet sich hieraus eine Clearance für diese Glukuronide, die mehr als 25mal so groß ist wie die der nicht eiweißgebundenen freien Substanz (vgl. Tab. 4).

Entsprechend verhält sich die Clearancerate.

$$\text{Clearancerate} = \frac{\text{Clearance (SDM oder SDM-Glukuronid)}}{\text{Clearance (Creatinin)}}$$

Die Glukuronide sind bedeutend geringer als die freie Verbindung an Eiweiß gebunden (RIEDER) und werden glomerulär filtriert, wahrscheinlich auch tubulär sezerniert (PETERS). Infolge ihres polaren, d. h. gut wasserlöslichen Chrakters unterbleibt eine passive Rückdiffusion. Inwieweit andere Prozesse ihr Erscheinen im Endharn beeinflussen, soll später diskutiert werden. Erwähnt sei aber hier schon der auffällige Befund, daß die Clearance der Glukuronide, trotz Filtration und tubulärer Sekretion bei fehlender passiver Rückdiffusion, niedriger als die Creatininclearance ist. (Vgl. Tab. 4)

Die Tatsache, daß durch Phenobarbital die Elimination von SDM aus dem Serum von Hunden beschleunigt ist, beruht zunächst auf einer vermehrten Ausscheidung von Madribon um das Dreifache (von 135 mg auf 401 mg). Es fragt sich, ob das ausreicht, die enorme Verkürzung der HWZ um das 2- bis 5fache zu erklären (vgl. Tab. 5).

Der enorme Anstieg des konjugierten SDM im Serum unter der Behandlung mit Phenobarbital auf das mehr als 10fache weist auf eine erhöhte Umsetzung von SDM in der Leber hin, wodurch ebenfalls die Konzentration des freien SDM im Serum sinken muß.

An Hand der folgenden Zusammenstellung, die der Versuch einer Bilanz über i. v. gegebenem und nach 24 Stunden wiedergefundenem SDM vor und unter der Phenobarbitalbehandlung darstellt, soll dieser Frage nachgegangen werden.

TABELLE 10

	KO			pH		
appl. Menge	1250			1250		
	frei	konj.	ges.	frei	konj.	ges.
URIN	110	210	320	321	161	482
FAECES	25	0,5	25,5	80	20	100
GESAMTAUSSCHEIDUNG	135	210,5	345,5	401	181	582
im extracellulären Raum nach 24 Stunden nachweisbar Konjugate	-	7,5			55	
Insgesamt nachweisbar	135	218	353	401	236	637
Aus dem Blut im Verteilungsgleichgewicht eliminiert in 24 Stunden	49 % in 24 Stunden		640	90 % in 24 Stunden		1130
nicht wiedergefunden			287			493

Die Zahlen beziehen sich auf einen Hund (ANKA) mit einem Gewicht von 25 kg. Die bei dem anderen Hund gefundenen Werte sind der Übersicht wegen weggelassen worden, entsprechen den dargestellten aber völlig.

Aus dieser Bilanz läßt sich folgendes entnehmen:

1) Es werden etwas mehr Konjugate gefunden. Die insgesamt nachweisbare Menge beträgt unter der Behandlung 236 mg, vorher 218 mg.

2) In Wirklichkeit müßte diese Menge viel größer sein. Dies ist, abgesehen vom Anstieg der Konjugate im extracellulären Raum, vor allem aus der enormen Vermehrung der Glukuronide in Faeces auf das 20fache bei einer Zunahme der gesamtausgeschiedenen Menge um das 4fache zu folgern. Der weitaus größte Teil bestand aus freiem SDM. Es ist aber sehr wahrscheinlich, daß durch die Wirkung der Darmbakterien konjugiertes Madribon inzwischen gespalten wurde (WILLIAMS u. Mitarbeiter). In vitro konnte dieses in eigenen Versuchen nachgewiesen werden. Außerdem fand WILLIAMS bei der Ratte, daß die konjugierte Verbindung zu 78 % über die Galle ausgeschieden wird:

Tabelle 11: Ausscheidung von SDM und SDM-Glukuronid durch die Galle

	Molekulargewicht	% der Dosis in 24 Stunden in der Galle	Art der ausgeschiedenen Verbindung:
Madribon	310	10,9	N_1-, N_4-Glukuronid Madribon
Madribon-N_1-Glukuronid	486	78	N_1-Glukuronid

Das würde besagen, daß auch die beim Hund in der Leber entstehenden Konjugate über die Galle ausgeschieden werden, vor allem dann, wenn es unter der Behandlung mit Phenobarbital zu einer vermehrten Glukuronidierung kommen sollte. Dafür sprechen auch die Befunde von REICH und REMMER (unveröffentl.), die bei der Ratte eine vermehrte Ausscheidung von Glukuroniden in die Galle nach Behandlung mit Luminal nachwiesen.

3) Die aufgrund der obigen Kalkulation nicht wiedergefundene Menge an SDM beträgt während der Behandlung 493 mg SDM und ist damit fast noch einmal so hoch wie vor der Behandlung. Dieser Unterschied beruht sehr

wahrscheinlich auf einer vermehrten Ausscheidung über die Galle. Denn die von SDM in Faeces nachgewiesene Menge gibt noch keine Auskunft über das im Darm insgesamt vorhandene SDM . Im Darm, auch schon in der Gallenblase, kann eine Rückdiffusion durch die Mukosazellen stattfinden. Dabei kann das freie Madribon infolge seiner Lipoidlöslichkeit sofort, nach hydrolytischer Abspaltung der Glukuronsäure auch das gebundene, wieder in das Blut aufgenommen werden. Wenn es nicht in den enterohepatischen Kreislauf gelangt, wird es in Faeces ausgeschieden, ebenso das nicht gespaltene Glukuronid.

4) Obwohl im Serum unter der Behandlung die Glukuronide um das mehr als 10fache und in Faeces auf das 20fache angestiegen sind, nimmt die gleiche Substanz im Urin von 210 auf 181 mg ab. Gleichzeitig aber steigt die Ausscheidung des freien Madribons von 135 auf 401 mg an. Es erhebt sich die Frage: Wodurch kommt es zu dieser merkwürdigen Erhöhung der Ausscheidung des freien SDM, die ganz andere Clearancewerte ergibt? (vgl. Tab. 4) Folgende Überlegungen könnten zu einer Antwort führen:

a) An Plasmaproteine gebundenes SDM könnte von dieser Bindung durch Phenobarbital verdrängt werden. Dadurch würde die Menge an ungebundenem, freiem SDM, das auch nur allein therapeutisch wirksam ist, im Plasma zunehmen. Dagegen ist aber einzuwenden, daß Phenobarbital nur zu 44 % an Eiweiß gebunden ist (ANTON) und kaum andere von den Plasmaproteinen viel stärker gebundene Substanzen zu verdrängen vermag. Auch müßte die nicht an Eiweiß gebundene Verbindung im Serum um das Dreifache ansteigen, um die ausgeschiedene Menge an freier Substanz in gleichem Verhältnis zu erhöhen. Aber das ist kaum vorstellbar. Ebensowenig verständlich ist die verminderte Ausscheidung des konjugierten SDM.

b) Die aus den SDM-Konzentrationen in Blut und Urin errechneten Clearances stellen keine exakten Größen dar. Die Einschränkungen,unter denen sie berechnet werden können, sind in den Ergebnissen schon genannt. Auch wenn gegen die Bestimmung der Clearancewerte infolge der hohen Labilität der N_4-Glukuronide erhebliche Einwände hervorgebracht werden können, so bleibt doch der Befund übrig, daß unter der Phenobarbitalbehandlung die Clearance des nicht chloroformlöslichen konjugierten Anteils auf etwa 1/10 absinkt.

c) Denkbar wäre, daß unter der Behandlung die hohe Clearance des freien und die niedrige des konjugierten SDM dadurch vorgetäuscht wird, daß ein Teil der konjugierten Verbindung bereits bei der Passage durch die Niere hydrolysiert wird, da das N_4-Glukuonid außerordentlich säurelabil ist (WILLIAMS). Außerdem ist eine fermentative Spaltung durch eine ß-Glukuronidase nicht ausgeschlossen. Experimentell läßt sich diese Vorstellung, ob ein beträchtlicher Teil des konjugierten Madribons in der Niere gespalten wird, nur dann bestätigen, wenn glukuronidiertes Madribon vor und während der Behandlung mit Phenobarbital injiziert wird. Aber auch diese Erklärung reicht nicht aus, um die abnormen Abnahmen der Clearance von konjugiertem SDM zu erklären. Denn unter der Annahme, daß die im Urin ausgeschiedene Menge nur aus konjugierten Verbindungen besteht, könnte die Clearance nur auf das dreifache ansteigen,

TABELLE 12

Konjugiertes SDM

	Clearance	ausgeschiedene Menge
vor Behandlung	2,1	210
währ. Behandlung	0,26	161
bei vollständiger Ausscheidung als Glukuronid	0,78	482

wäre also immer noch viel niedriger als vor der Phenobarbitalbehandlung, so daß ein weiterer Faktor für die Hemmung der Ausscheidung von konjugiertem Madribon verantwortlich sein muß.

d) Infolge eines möglichen hemmenden Einflusses von Phenobarbital auf die Tubuluszellen könnte die Transportkapazität für Glukuronide

---

Clearance des konjugierten SDM vor und während der Behandlung im Vergleich zu der evtl. Clearance während der Behandlung bei vollständiger Ausscheidung als Glukuronid.

herabgesetzt werden. SØRENSEN beobachtete, daß bei Hunden, die mit Pentobarbital narkotisiert waren, das Transportmaximum für PAH herabgesetzt war. Ein eigener Versuch ergab bei einem ebenfalls mit Pentobarbital in ähnlich hoher Konzentration behandelten Hund eine Verminderung der ausgeschiedenen Menge konjugierten SDM's um 40 % und das gesamt ausgeschiedene SDM um den gleichen Betrag (HILDEBRANDT und REMMER, nicht veröff.). Phenobarbital könnte in ähnlicher Weise die Ausscheidung von konjugiertem SDM hemmen. Wie wäre das möglich?

Wie oben erwähnt, ist das SDM-Glukuronid nur geringgradig an Eiweiß gebunden und wird unter normalen Bedingungen daher in hohem Maß glomerulär[1] filtriert; eine lumenwärts gerichtete Sekretion kann nicht von zu großer Bedeutung sein. Die unter den genannten Vorbehalten berechnete Clearance von konjugiertem SDM ergibt bei unbehandelten Hunden einen Wert, der weit unter der von HOUCK an 70 Hunden gemessenen Clearance von Creatinin liegt (vgl. Tab. 4). Das aber bedeutet, daß eine große Menge des im Ultrafiltrat bzw. proximal erscheinenden SDM-Glukuronids ebenfalls im Tubulus wieder rückresorbiert werden muß, da eine nichtionische, passive Rückdiffusion infolge des stark polaren Charakters dieser Verbindung nicht möglich ist. Dieser Befund kann nur, allerdings unter der Voraussetzung, daß eine Spaltung nicht stattfindet, durch eine aktive Rückresorption, also eine Sekretion in umgekehrter Richtung vom Lumen in das Plasma, erklärt werden. An diese Möglichkeit wurde von SMITH, PETERS und WEINERT gedacht. Da aus diesen Ergebnissen unter der Phenobarbitalbehandlung mit Sicherheit auf eine starke Minderung der Clearance der konjugierten Substanz zu schließen ist, könnte diese nur durch eine verstärkte Sekretion vom Lumen in die Zelle verursacht werden. Unter Phenobarbital müßte dann dieser Vorgang auf das 10fache gesteigert sein. Aber auch diese Erklärung wäre letzten Endes nicht befriedigend. Denn wie sollte man die vermehrte Ausscheidung von freiem Madribon in diesem Zusammenhang deuten? Diese Frage konnte im Rahmen der Untersuchungen nicht mehr geklärt werden. Bestehen bleibt aber als Ergebnis, daß eine vermehrte Glukuronidierung erfolgt, und daß diese der Anlaß für die Veränderung der Nierenfunktion ist, wobei auch die Ausscheidung von Phenobarbitalglukuroniden störend eingreifen könnte, da Phenobarbital beim Hund zu mehr als 50 % als ein

p-Hydroxyphenobarbitalglukuronid ausgeschieden wird (BUTLER).

Es ist möglich, die vermehrte Glukuronidierung als Ausdruck einer gesteigerten allgemeinen vermehrten Aktivität der Zelle speziell des endoplasmatischen Retikulums anzusehen. Unter dem Einfluß gewisser Pharmaka, u. a. Phenobarbital (REMMER) und anderer Fremdstoffe, die sich alle durch eine hohe Lipoidlöslichkeit auszeichnen, wird die Zelle zu erhöhter Stoffwechseltätigkeit angeregt oder "induziert". Diese Induktion kann als Adaptation, speziell der Leber, an unphysiologische Substanzen angesehen werden und führt zu einer bisher nur bekannten gesteigerten Tätigkeit mikrosomaler Enzyme (REMMER, CONNEY, BURNS). Dabei wurden nicht nur oxydierende Enzyme des endoplasmatischen Retikulums vermehrt gefunden, sondern auch hydroxylierende und reduzierende, die alle am Abbau von Fremdstoffen, speziell an ihrer Umwandlung von lipoidlöslichen in weniger lipoidlösliche, beteiligt sind.
Es besteht die Möglichkeit, daß auch transferierende Fermente in größerem Umfang vermehrt gebildet werden können, die so zu einer verstärkten Umwandlung von Sulfonamiden in besser ausscheidbare Verbindungen durch Azetylierung oder Glukuronidierung führen. Auch unter der Behandlung mit Phenobarbital kam es bei Hunden in obiger Untersuchung zu keiner Azetylierung. Die Unfähigkeit des Hundes, Sulfonamide, überhaupt Arylamine zu azetylieren, ist seit langem bekannt; Untersuchungen darüber von MUENZEN, CERCEDO, SHERWIN und MARSHALL (LEIBMANN und ANACLERO), konnten zu keiner Klärung dieses Unvermögens führen.

Eine vermehrte Glukuronidierung von Arzneimitteln durch vermehrte Bildung von übertragenden Enzymen vermutete man, als bemerkt wurde, daß Pharmaka, die mikrosomale Oxydierungsvorgänge steigerten, außerdem eine vermehrte Ausscheidung von Glukuronsäure und Ascorbinsäure bewirkten (BURNS et al.). TOUSTER beobachtete die durch Barbital und Chlorethon aktivierbare Wirkung der UDP-Glukosedehydrogenase, die zu einer vermehrten Bildung von aktivierter Glukuronsäure führte.
Bei mit Phenobarbital behandelten Ratten war keine Stimulierung der Transferasetätigkeit zu bemerken, wenn Salizylsäure als Aglykon vorlag (REMMER, NITZE). Dagegen hatten INSCOE und AXELROD eine Steigerung

der Glukuronidierung bemerkt, wenn carzinogene Substanzen, wie 3-Methylcholanthren, 3,4-Benzpyren und 1,2,5,6,-Dibenzanthrazen, zur Vorbehandlung gewählt wurden (INSCOE, AXELROD, TOUSTER). REMMER gelang der Nachweis einer vermehrten Glukuronidierung von SDM bei Ratten, die zu einer gesteigerten Elimination von SDM aus dem Blut führte.

Wenn am Anfang gefragt wurde, ob zur Erklärung der bei Hunden unter der Behandlung mit Phenobarbital gefundenen beschleunigten Elimination von SDM eine vermehrte Glukuronidierung angenommen werden muß, so kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen in Einklang mit den oben zitierten Arbeiten auf eine solche geschlossen werden: Infolge einer gesteigerten Transferasetätigkeit kommt es zur vermehrten Bildung gut wasserlöslicher Verbindungen, die entweder bei ihrer Passage durch die Niere vermehrt gespalten werden oder aber infolge einer Nierenfunktionsänderung durch die Niere vermindert und kompensatorisch durch die Galle vermehrt ausgeschieden werden. Falls es in der Niere tatsächlich zu der diskutierten aktivierten Sekretion kommen sollte, so wäre dieses die eine Seite einer unter Phenobarbital gesteigerten allgemeinen Zelleistung, deren andere Seite die vermehrte Glukuronidierung darstellt.

Abgesehen von dem pharmakodynamischen Aspekt, den die vorliegenden Ergebnisse bieten könnten, ist die Bedeutung dieser Untersuchung für die Chemotherapie folgende:

Durch die beschleunigte Elimination von SDM unter der Behandlung mit Phenobarbital bleibt die Konzentration des freien nicht an Eiweiß gebundenen SDM unter der therapeutischen Schwelle. Dieses wird auch dann der Fall sein, wenn als Kriterium der Wirksamkeit von Sulfonamiden nicht so sehr die Konzentration der wirksamen Substanz in der Umgebung der Bakterien angesehen wird, sondern die Bindung an Strukturen und Substanzen (RIEDER), die zur Erzielung der Hemmwirkung besetzt werden müßten.

Zusammenfassung

1) Die Elimination von Sulfadimethoxin (MADRIBON ^{R}), einem Langzeitsulfonamid, ist neben der Bindung an Plasmaproteine, der Art und Weise der renalen Ausscheidung, der Lipoidlöslichkeit und dem pH des Urins vor allem abhängig von der Umwandlung in schneller ausscheidbare Verbindungen. Dies geschieht besonders in der Leber.

2) Erhalten Hunde 50 mg/kg SDM i.v. appliziert, so findet eine langsame Elimination aus dem Serum statt. Die HWZ der freien Substanz liegt bei Hunden mit 26 - 28 Stunden etwas niedriger als beim Menschen. Im Urin erscheint ein großer Teil des SDM als eine in Chloroform unlösliche Verbindung, von der im Blut nur Spuren nachweisbar sind. Ein azetyliertes Produkt ist weder im Urin noch im Serum zu finden. Die papierchromatographische Aufarbeitung ergab, daß es sich dabei um zwei bis drei in Serum und Urin gleiche, hochpolare Substanzen handelte, die den bekannten N_1- und N_4-Glukuroniden gleichzusetzen sind.

3) Unter der Behandlung mit Phenobarbital kam es zu einer dosisabhängigen Steigerung der Eliminationsgeschwindigkeit. Sie ging mit einer vermehrten Bildung der polaren Substanz im Serum und in Faeces einher. Waren dabei im Urin sowohl das freie SDM,als auch die insgesamt ausgeschiedene Madribonmenge vermehrt vorhanden, so wurden wasserlösliche konjugierte Verbindungen in viel geringerem Umfang als bei den Kontrollen gefunden. Die daraus resultierenden Clearanceänderungen können teilweise zu Lasten einer vermehrten Hydrolyse der Konjugate gehen oder aber auf einer Nierenfunktionsänderung beruhen, deren Ursachen diskutiert werden.

Auf die therapeutische Bedeutung dieser Ergebnisse wird hingewiesen.

Literatur

1. Anton, A. H.: The relation between the binding of sulfonamids to albumine and their antibacterial efficacy. J.Pharm. exp. Ther. 129, 282 (1960)

2. Anton, A. H.: A Drug induced change in the distribution and renal excretion of sulfonamids. J. Pharm. exp. Ther. 134, 291 (1961)

3. Assheim, A., Persson, F., Persson, S.: Renal clearance in dogs with regard to age and sex. Acta physiol. scand. 51, 150 (1961)

4. Axelrod, J.K., Inscoe, J. K. and G. M. Tomkins: Enzymatic synthesis of N-Glucosyluronicacid conjugation. J. Biol. Chem. 232, 835 (1958)

5. Beyer, H.: Lehrbuch der organischen Chemie. VIII. Auflage, Leipzig 1961

6. Bratton, A. D., Marshall jr. E. K.: A new coupling component for Sulfanilamide determination. J. Biol. Chem. 128, 537 (1939)

7. Brodie, T. M., J. A. Bain: Barbiturates and Oxidative-Phosphorylation J. Pharm. exp. Ther. 110, 148 (1954)

8. Bridges, J. W. and R. T. Williams: N-Glucuronide formation in vivo and in vitro. Bioch. J. 83, 27 (1962)

9. Bridges, J. W., Kibby, M. R. and R. T. Williams: The nature of the glucuronide of Madribon formed in man. Bioch. J. 91/2, 12 (1964)

10. Burns, J. J., Conney, A. H., Dayton, P. G., Martin, G. R. and Tallr, D. and Evans, C.: Observation on the drug-induced synthesis of D-glucuronic, L-gulonic, and L-ascorbicacids in the rats. J. Pharm.exp. Ther. 129, 132 (1960)

11. Butler, T. C.: The metabolic hydroxylation of phenobarbital. J. Pharm. exp. Ther. 116, 326 (1956)

12. Conney, A. H., Davison, C.,R.Gastel and J. J. Burns: Adaptive increases in drug-metabolizing enzymes induced by Phenobarbital and other drugs. J. Pharm. exp. Ther. 130, 1 (1960)

13. Corcoran, A. D. and J. H. Page: Effects of anaesthetic dosage of Pentobarbital sodium on renal function and blood pressure in the dog. Am. J. Physiol. 140, 234 (1943)

14. Davis, B. D.: Binding of sulfonamides by plasma proteins.
Science 95, 78 (1942)

15. Dutton, G. J.: Glucuronide Conjugation.
1st Intern. Pharmacol. Meeting, Vol. 6, 39 (1961)

16. Fust, B., Böhn, E., Schnitzer R. J., Rieder, J. und T. H. Struler:
Experimentelle und klinische Daten über Madribon.
Antibiotica und Chemotherapia, Vol. 8, S. Karger, Basel, N. Y.

17. Halberkan, J. und F. J. Frettwurst: Stoffwechsel des Pyramidons und
verwandter Verbindungen beim Menschen.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chemie 285, 97 (1950)

18. Hecht, G., Guntzmann, K., Langecker, H., Glaxhuber, Ch., Harwort, A.
und Wirtz, A.: Pharmakologie des 2-Sulfanilamido-5-methoxy-
pyrimidin.
Arzneimittelforschung 11, 695 (1961)

19. Houck, C. R.: Statistical analysis of filtration rate and effective renal
plasmaflow related to weight and surface area in the dog.
Am.J. Physiol. 153 (1948)

20. Inscoe, J. K. and.J. A. Axelrod: Some factors affecting glucuronide
formation in vitro.
J. Pharm. exp. Ther. 129, 128 (1960)

21. Kamil, J. A., Smith, J. N. and R. T. Williams: A study of the optical
rotations of the amides and triacetyl-methyl-esters of some
biosynthetic substituted phenyl-glucuronides.
Biochem. J. 50, 235 (1952)

22. Koechlin, B. A., Kern, W. and Engelberg R.: A comperative study of the
metabolism and the urinary excretion of 2,4-dimethoxy-6-
sulfanilamido-1,3-diazine (Madribon).
Antibiotics Med. Cli. Ther., Suppl. 1 (1959), Bd. 6, 22

23. Krebs, H. A., Sykes, W. O. and W. C. Bartley: Acetylation and deacetyla-
tion of p-aminogroup of sulfanilamide drugs in animal tissues
Bioch. J. 41, 622 (1947)(

24. Langecker, H.: Über das Schicksal der Sulfonamide im Organismus.
Arch. exp. Path. Pharmakol. 211, 367 (1956)

25. Langecker, H. und H. Witzgall: Beziehungen zwischen Stoffwechselvorgängen
und renalem Ausscheidungsmechanismus bei Sulfonamiden.
Klin. Wschr. 40, 32 (1962)

26. Leibman, K. C. and A. M. Anacleiro: Comperative studies on sulfanilamide
acetylation; an inhibitor in dog liver.
Proc. 1st Intern. Pharmac. Meeting, Vol. 6, 91 (1961),
Pergamon Press, Oxford, London, N. Y.

27. Marshall, E. K.: Acetylation of sulfanilamids in the dog.
J. Biol. Chem. 211, 499 (1954)

28. Muenzen, J. B., Cercedo, L. R. and C. Sherwin: Comperative metabolism of certain aromatic acids.
VIII. Acetylation of aminocompounds.
J. Biol. Chem. 67, 469 (1926).

29. Nitze, H. R. und H. Remmer: Der Einfluß von Barbituraten auf die Förderung der Glukuronsäureausscheidung.
Arch. exp. Path. Pharmak. 242, 555 (1962)

30. Peters, L.: Urinary Excretion of Drugs.
Proc. Ist Intern. Pharmacol. Meeting, Vol. 6, 179 (1961)

31. Portwich, F., Büttner, H. und K. Engelhardt: Nierenausscheidung und Eiweißbindung von Sulfonamiden.
Klin. Wschr. 41, 447 (1963)

32. Remmer, H.: Drug-induced formation of smooth endoplasmatic reticulum and of drug metabolizing enzymes.
Exc. Med. Intern. Congr. Series No. 81, Vol. 4, Cambridge, July 1964

33. Remmer, H.: Drug Tolerance. Ciba Found. Symp. Enzymes and Drug Action, 276 (1962)

34. Remmer, H. und M. Siegert: Beschleunigter Arzneimittelabbau durch Enzyminduktion beim Hundenach Behandlung mit Phenobarbital.
Arch. exp. Path. Pharmak. 11, 779 (1962)

35. Remmer, H., Siegert M. und H. J. Merker: Vermehrung arzneimittelabbauender Enzyme durch Tolbutamid.
Arch. exp. Path. Pharmak. 249, 71 (1964)

36. Remmer, H.: Vermehrte Glukuronidierung von Sulfadimethoxin während und nach der Phenobarbitalbehandlung bei Ratten.
Arch. exp. Path. Pharmak. 247, 461 (1964)

37. Remmer, H.: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal.
Arch. exp. Path. Pharmak. 235, 279 (1959)

38. Remmer, H.: Drugs as activators of drug enzymes.
Proc. 1st Intern. Pharmac. Meeting, Vol. 6, 235 (1962)

39. Remmer, H.: Hemmung und Steigerung mikrosomaler Oxydationen durch körpereigene Stoffe.
Sympos. Redoxfunktionen cytoplasmatischer Funktionen. 75(1962)

40. Remmer, H. und H. J. Merker: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital.
Klin. Wschr. 41, 276 (1963)

41. Remmer, H.: Die Beschleunigung von enzymatischen Oxydationen in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Barbituraten.
Arch. exp. Path. Pharmak. 236, 7 (1959)

42. Rieder, J.: Physikalisch-chemische und biologische Untersuchungen an Sulfonamiden.
Arzn.-Forsch. 13, 81 (1963)

43. Sakai, K., Tochino, Y. and K. Kishiwada: Concentrations in the body fluid of sinomin (Sulfisomerazol, MS-53) a new sulfonamide.
Study Meeting of the "Japon Antibiotica Research Association" (1959)

44. Scholtan, W.: Die Bindung der Langzeitsulfonamide an die Eiweißkörper des Serums.
Arzn.-Forsch. 11, 707 (1961)

45. Siegert, M., Ahlsleben, B., Liebenschütz, W. und H. Remmer: Unterschiede in der mikrosomalen Oxydation und Azetylierung von Arzneimitteln bei verschiedenen Arten und Rassen.
Arch. exp. Path. Pharmak. 247, 509 (1964)

46. Smith, J. N. and R. T. Williams: The metabolism of sulfonamids.
Biol. J. 42, 351 (1948)

47. Støren, E. J.: Effect of Pentobarbital Anesthesia on Tm_{PAH} in the Dogs.
Am. J. Physiol. 192/2, 387 (1958)

48. Støren, E. J.: Effect of Pentobarbital Sodium on Uptake of PAH by Rat Kidney Cortex Slices in vitro.
Am. J. Physiol. 195, 343 (1958)

49. Tochino, Y.: Unveröffentlicht.

50. Touster, O., Holstmann, S., O. Pineda und S. Shumaker: Diskussionsbeitrag zu 15.

51. Walter, A. M.: Bakteriostatische Wirksamkeit und Pharmakodynamik der neuen Sulfonamide.
Antibiotica und Chemotherapia 8, 54, S. Karger, Basel / N. Y.

52. Weiner, I. M., Washington, J. A. II. and G. H. Mudge: Studies on the renal excretion of salizylate in the dog.
Bull. John Hopkins Hosp. 105, 284

53. Weiner, I. M., Garlid, K., Romeo, J. A. and G. H. Mudge: Effects of tubular secretion and reabsorption on titration curves of tubular transport.
Am. J. Physiol. 200, 393 (1961)

54. Winton, Fr.: Modern views on the secretion of urine.
Cushing memorial lectures, I. Aufl. (21), 1956

55. Williams, R. T.: Detoxication mechanism.
Chapman and Hall Ltd., London, 1959

56. Williams, R. T. and. D. V. Parke: The metabolic fate of drugs.
Ann. Rev. of Pharmacol. 4, 85 (1964)

57. Williams, R. T., Millburn, P. and R. L. Smith: The influence of enterohepatic circulation on toxicity of drugs.
Ann. of the N. Y. Acad. of Scie. 123, Art. 1 (110), 1964

Herrn Professor Dr. med. Hans H e r k e n danke ich
für die freundliche Aufnahme am Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Herbert R e m m e r
für die Überlassung des Themas sowie für die ständige Hilfe und
richtungweisende Anleitung für das Zustandekommen dieser Arbeit.

Lebenslauf

Ich, Alfred Georg Hildebrandt, wurde am 11. Februar 1937 in Marienwerder/Westpreußen als Sohn des Stadtinspektors Johannes Hildebrandt und dessen Ehefrau Elisabeth geb. von Kowalkowski geboren.

Nach dem Abitur im Jahre 1957 am Stefan-George-Gymnasium in Bingen/Rhein studierte ich zunächst in Mainz Philosophie und katholische Theologie. Nach dem Wechsel in die medizinische Fakultät blieb ich in Mainz bis zum Physikum. Das klinische Studium begann ich in Innsbruck und studierte dann weiter bis zum Staatsexamen an der Freien Universität in Berlin am 26.3.1965.